

# 新型コロナウイルスゲノム解読プロトコル

Oxford Nanopore Mk1c &  
NEB 社 ARTIC SARS-CoV-2 Companion Kit (ONT) 編

- version 1.6 (2022/01/27)-

国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター

糸川健太郎、関塚剛史、橋野正紀、小神野明紀菜、田中里奈、

衛藤皐、染野里紗、黒田誠

\* 本資料に記載されたプロトコルは研究および調査の目的に限り使用できるものであり、体外診断等の目的に使用されるものではありません。本資料の内容およびプロトコルの正当性はいかなる法令等により担保されるものではなく、使用される方ご自身の責任に基づき正しく実験を行いその結果を解釈してください。また本資料の内容は予告なく改定・変更される場合があります。

変更履歴

v1.2	中断可能ポイントを追記。 至適サイクル数について追記。 <b>9. Flow cell 洗浄</b> で、Storage バッファーを注入後 Waste port 1 からの除液操作を追記。 Zip ファイルの名前について追記。 FAQ を作成。
v1.3	プライマー-version N3 を追記。
v1.4	誤字等の修正。 4-1 (End-prep & Barcode 結合) で少数検体の際にインプット DNA 量を上げられるという記述を削除・修正。 プライマー-version N3.2 を追記。 EXP-NBD196 kit について追記。 Bias Voltage の設定について追記。
v1.5 (2021/12/03)	プライマー-version N4、ARTIC V4、NEB VarSkip Short を追記。 EXP-NBD196 のバーコードの並び順について追記。
V1.6 (2022/01/27)	動画リンクを追加。 プライマー-version N5 を追記

## 使用する試薬・器具等

### 試薬等消耗品

- NEB 社 ARTIC SARS-CoV-2 Companion Kit (Oxford Nanopore Technologies®) (E7660S/L)

概要:

Mk1C で解析するライブラリを調整するために必要な酵素類が含まれている。

内容:

LunaScript® RT SuperMix (5X)

Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix

NEBNext ARTIC SARS-CoV-2 Primer Mix 1 (感染研プロトコルでは使用しない)

NEBNext ARTIC SARS-CoV-2 Primer Mix 2 (感染研プロトコルでは使用しない)

NEBNext Ultra II End Prep Enzyme Mix

NEBNext Ultra II End Prep Reaction Buffer

Blunt/TA Ligase Master Mix

NEBNext Quick T4 DNA Ligase

NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer

NEBNext Sample Purification Beads

- ONT 社 Oxford Nanopore Technologies Native Barcoding Expansion Kits 1-12 (EXP-NBD104), 13-24 (EXP-NBD114), 1-96 (EXP-NBD196)

概要:

バーコードアダプターおよびシーケンシングアダプター。

内容:

Native barcode NBD01- NBD12 (EXP-NBD104), NBD13- NBD24(EXP-NBD114) or NBD01-96 (EXP-NBD196)

Adapter mix II, AMII

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96

EXP-NBD196 の各バーコードは、(多くの人の直感に反して・・・) 行方向に並んでいるので注意

**!2021年11月現在、EXP-NBD196は新たな梱包に代わり、各バーコードは列方向に並んでいるので、良く確認されたい。**

- ONT 社 Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109)

概要:

Mk1C を購入時にセットでついてくる。バーコーディング無しの 1 D シーケンシングプロトコルに使用する。いくつかの付属試薬は本プロトコルでも使用できる。

内容(本プロトコルで使用するもののみ):

Short fragment buffer (SFB)

Elution buffer (EB)

Sequencing buffer (SQB)

Loading beads (LB)

- Sequencing Auxiliary Vials (EXP-AUX001)

概要:

シーケンシングに必要なバッファー類のセット。6 ラン分。

内容:

Elution buffer (EB)

Sequencing buffer (SQB)

Loading beads (LB)

- ONT 社 SFB Expansion (EXP-SFB001)

概要:

SFB の単体販売品。

内容:

Short fragment buffer (SFB)

- ONT 社 Flow cell Priming Kit (EXP-FLP002)

概要:

フローセルの priming に必要なバッファー類のセット。6 ラン分。

内容:

Flush buffer (FB)

Flush tether (FLT)

- ONT 社 Flow Cell Wash Kit (EXP-WSH004)

概要:

フローセルを洗浄し再使用するために必要な試薬類。6 回分。

内容:

Wash Mix (WMX)

Wash Diluent (DIL)

Storage Buffer (S)

- ThermoFisher 社 Qubit dsDNA HS Assay Kit (Q32854)

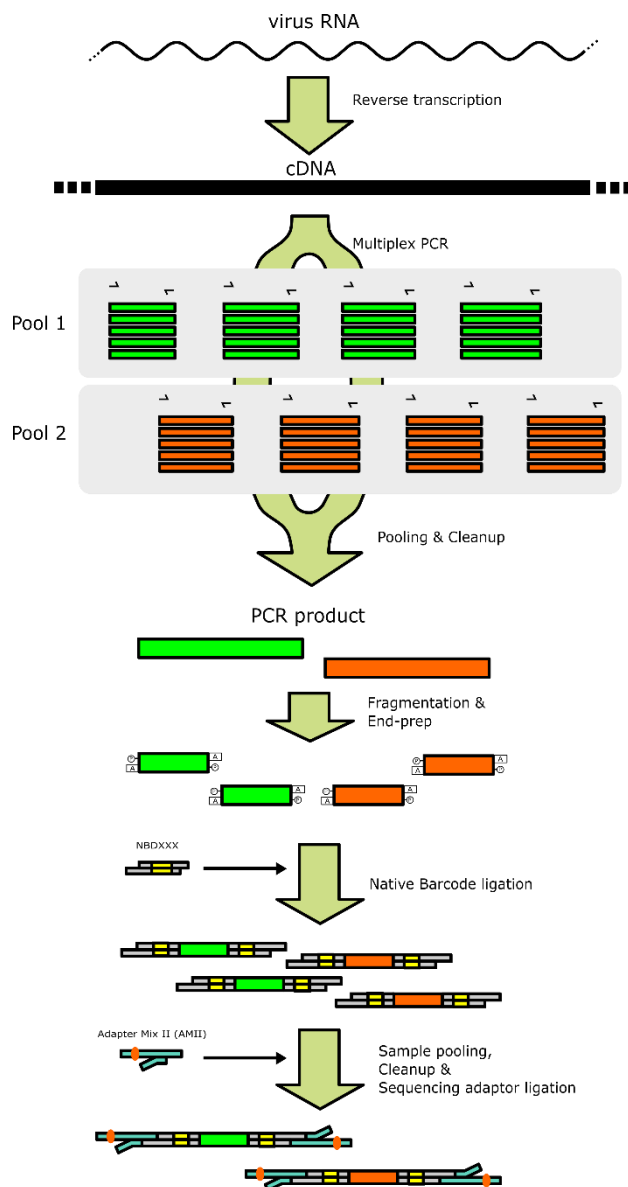
- 80% エタノール溶液 (用時調整)

器具・機器等

- ThermoFisher 社 Qubit Flex Fluorometer
- PCR Thermal Cycler
- マグネットセパレーター
- 卓上ミニ遠心機 (スピンドウン用)
- 低吸着性エッペンチューブ (1.5 ml)
- その他基本的な実験器具類

### 本プロトコルについて

本プロトコルの主要部分は英国の研究者らを中心としたグループ、ARTIC Network (<https://artic.network/ncov-2019>) によって開発された。また、ライブラリ作成に関しては NEB 社のキットを使用し、マニュアルとほとんどの部分で同一である。変更点として、multiplex PCR にキット付属のプライマーではなく感染研で開発した NIID ver.3 (N3) プライマーセットを用いる。



## Multiplex PCR primer について

Multiplex PCR のプライマーセットには複数のバージョンが存在する。

- ARTIC Network V1: 2020 年 1 月に発表されたオリジナルのプライマーセット。改良されて現在では使われていない。  
[https://github.com/artic-network/artic-ncov2019/tree/master/primer\\_schemes/nCoV-2019/V1](https://github.com/artic-network/artic-ncov2019/tree/master/primer_schemes/nCoV-2019/V1)
- NIID ver.N1: 感染研による ARTIC Network V1 の改良版 (Itokawa et al., PLOS ONE, e0239403, 2020)。12 本のプライマーを変更している。  
[https://github.com/ItokawaK/Alt\\_nCov2019\\_primers/tree/master/Primers/ver\\_N1](https://github.com/ItokawaK/Alt_nCov2019_primers/tree/master/Primers/ver_N1)
- NIID ver.N2: NIID ver.N1 に 72\_RIGHT\_C22A というプライマー一本を Pool2 追加 (2021 年 3 月)。国内で散見してみられる E484K 保有系統 (R.1) のゲノムで生じるミスマッチ (G22017T) に対応した形。  
[https://github.com/ItokawaK/Alt\\_nCov2019\\_primers/tree/master/Primers/ver\\_N2](https://github.com/ItokawaK/Alt_nCov2019_primers/tree/master/Primers/ver_N2)
- NIID ver.N3: NIID ver.N2 に 72\_RIGHT\_b16172a というプライマー一本を Pool2 追加 (2021 年 6 月)。変異株 B.1.617.2 系統のゲノムで生じるミスマッチ ( $\Delta$ 22029-22034) に対応した形。  
[https://github.com/ItokawaK/Alt\\_nCov2019\\_primers/tree/master/Primers/ver\\_N3](https://github.com/ItokawaK/Alt_nCov2019_primers/tree/master/Primers/ver_N3)
- NIID ver.N3.2: NIID ver.N3 の 64\_LEFT & 64\_RIGHT の濃度を二倍にした (2021 年 8 月)。変異株 B.1.617.2 系統のゲノムで生じるミスマッチ (C19220T) に対応した形。
- NIID ver.N4: NIID ver.N3 に 5 本のプライマーを追加し、B.1.1.529 オミクロン株に対応。国内で R.1 株が途絶えたと考えられることから 72\_RIGHT\_C22A を除外 (2021 年 12 月)。
- **NIID ver.N5:** NIID ver.N4 に 3 本のプライマーを追加し、BA.2 (B.1.1.529.2) オミクロン株に対応。(2022 年 1 月)。  
[https://github.com/ItokawaK/Alt\\_nCov2019\\_primers/tree/master/Primers/ver\\_N4](https://github.com/ItokawaK/Alt_nCov2019_primers/tree/master/Primers/ver_N4)
- ARTIC Network V4: ARTIC Network によるオリジナル (V1) の改良版。  
[https://github.com/artic-network/artic-ncov2019/tree/master/primer\\_schemes/nCoV-2019/V4](https://github.com/artic-network/artic-ncov2019/tree/master/primer_schemes/nCoV-2019/V4)
- 1200 bp PCR amplicons: Freed et al (2020)によるデザイン。アンプリコンが長いのでプライマーの本数が少なく済む。Ct 値の低い検体であっても、断片化の程度によっては増えにくい。  
<https://www.protocols.io/view/ncov-2019-sequencing-protocol-rapid-barcoding-1200-bh7hj9j6>
- NEB VarSkip Short: NEB 社により変異株のゲノム解析のために、新しく開発された。NEB 社のライブラリキットに同梱される。<https://github.com/nebiolabs/VarSkip>

感染研では現在 **NIID ver.N4** プライマーセットを用いている。プライマーは Pool 1 で (奇数番号プライマー) 101 本、Pool 2 (偶数番号プライマー) 各 101 本、合計 202 本ある。プレート合成等のプランで合成依頼すると安価である。合成したプライマーは、予め Pool 1 と Pool 2 のプライマー同士をそれぞれ以下のように混合し、全体濃度が 50  $\mu$ M となるようにする。

(例 N5) 各プライマーのストック濃度が 50  $\mu$ M

Pool 1 (奇数番号)		Pool 2 (偶数番号)	
Primer name	vol	Primer name	vol
nCoV-2019_1_LEFT	10 $\mu$ l	nCoV-2019_2_LEFT	10 $\mu$ l
nCoV-2019_1_RIGHTv2	10 $\mu$ l	nCoV-2019_2_RIGHT	10 $\mu$ l
nCoV-2019_3_RIGHT	10 $\mu$ l	nCoV-2019_4_RIGHT	10 $\mu$ l
...	...	...	...
nCoV-2019_97_RIGHT	10 $\mu$ l	<sup>a</sup> nCoV-2019_64_LEFT	20 $\mu$ l
<sup>d</sup> nCoV-2019_73_LEFT_b11529b	10 $\mu$ l	<sup>a</sup> nCoV-2019_64_RIGHT	20 $\mu$ l
<sup>d</sup> nCoV-2019_75_RIGHT_b11529a	10 $\mu$ l	...	...
<sup>d</sup> nCoV-2019_83_LEFT_b11529a	10 $\mu$ l	<sup>b</sup> nCoV-2019_74_LEFT	20 $\mu$ l
<sup>e</sup> nCoV-2019_9_LEFT_b16172a	10 $\mu$ l	<sup>b</sup> nCoV-2019_74_RIGHT	20 $\mu$ l
<sup>e</sup> nCoV-2019_15_LEFT_b11529a	10 $\mu$ l	...	...
		nCoV-2019_98_RIGHT	10 $\mu$ l
		<sup>c</sup> nCoV-2019_72_RIGHT_b16172a	10 $\mu$ l
		<sup>d</sup> nCoV-2019_76_LEFT_b11529a	10 $\mu$ l
		<sup>d</sup> nCoV-2019_92_LEFT_b11529a	10 $\mu$ l
		<sup>e</sup> nCoV-2019_34_RIGHT_b11529a	10 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>1010 <math>\mu</math>l</b>	<b>Total</b>	<b>1050 <math>\mu</math>l</b>

ストック濃度が 100  $\mu$ M の場合、プール後に水 (or Tris-HCl pH8.0) で 2 倍に希釈する。

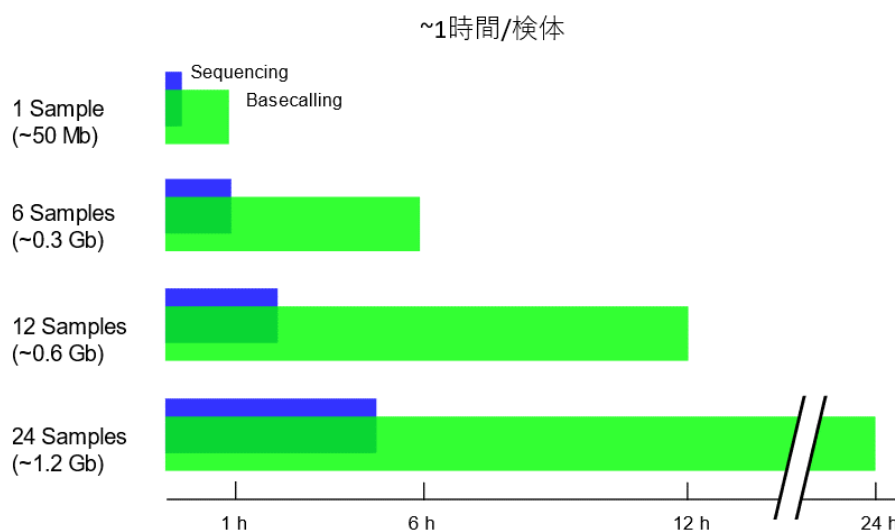
- デルタ株 C19220T ミスマッチに対応するためプライマー濃度を二倍に上げている。
- アンプリコン 74 は増幅が悪いためプライマー濃度を二倍に上げている。
- B.1.617.2 株の変異に対応するために N3 から追加された。
- B.1.1.529 株の変異に対応するために N4 から追加された。
- BA.2(B.1.1.529.2) 株の変異等に対応するために N5 から追加された。



## 注意事項

- 検体 RNA の Ct 値について

フローセル R9.4.1 自体は 400 Mb/h を超える速度でシグナルデータ (fast5) を取得することができるが、実際のところ Mk1c では 50 Mb/h 程度の速度でしかベースコール (fast5 から fastq への計算) が行われぬ。従って、12 検体の解析を終了するために一検体 50 Mb の配列データを基準とすると 12 時間ほどの時間を要する。単位時間あたりに解析できる検体数に限りがあるため、できる限りゲノム確定が確実な RNA 検体 (Ct 値 < 26) に対象を絞って解析を行うとよい。ただし、様々な理由で公衆衛生上重要と考えられる検体に関しては Ct 値が高くともこの限りではない。ゲノム確定は無理だが系統の分類なら可能という基準はおおよそ Ct < 31 程度である。



Mk1C での解析時間例

- 鋳型 RNA、PCR 産物 DNA のコンタミネーションには十分注意すること  
Multiplex PCR を反応液調整する作業と、Multiplex PCR 後のサンプルを処理する作業 (3. プーリング・精製以降) は場所、器具類等を共有しないようにすることが重要である。
- フローセルの再利用について

フローセルは wash kit を用いることで再生できるが、flow cell check (Mk1c マニュアル参照)において pore 数が 400 を下回ったものに関しては使わないようにする。

Mk1c の使用方法等に関しては、ナノポア社提供の日本語マニュアルを熟読し参照すること。

## プロトコル

### 1. 逆転写反応

使用する試薬:

LunaScript RT SuperMix

[ [動画](#)]

1-1 PCRプレート (or 8 連チューブ) 各ウェルに LunaScript RT SuperMix と検体 RNA を加え混合し、シールする。

RT 反応液

試薬	分量
LunaScript RT SuperMix	2 $\mu$ L
精製 RNA	8 $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>10 <math>\mu</math>L</b>

1-2 サーマルサイクラーで次の反応を行なう。

25°C	2 min
55°C	20 min
95°C	1 min
4°C	Hold

#### ■ 逆転写反応および multiplex PCR に関する注意点

- 鋳型 RNA、PCR 産物 DNA のコンタミネーションには十分注意すること。特に、Multiplex PCR 後のサンプルを処理する作業 (3. プーリング・精製以降) とは場所、器具類等を共有しないようにすることが重要。

## 2. Multiplex PCR

使用する試薬:

Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix

Multiplex PCR primer sets

[  [動画](#) ]

**2-1** 次の PCR のマスターミックスを調製し、PCR 用のプレート (or 8 連チューブ) の各ウェルに分注する。一つの検体について二つの反応 (Pool 1, Pool 2) があることに注意。

Multiplex PCR Master Mix		
試薬	Pool1 reaction	Pool2 reaction
Milli-Q 水	1.4 $\mu$ L	1.4 $\mu$ L
Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	6.25 $\mu$ L	6.25 $\mu$ L
Primer Pool 1 (50 $\mu$ M)	0.35 $\mu$ L	-
Primer Pool 2 (50 $\mu$ M)	-	0.35 $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>8 <math>\mu</math>L</b>	<b>8 <math>\mu</math>L</b>

**2-2** cDNA のうち、**4.5  $\mu$ L** を Pool 1 と Pool 2 の両反応液にそれぞれ加え、シールする。

**2-3** サーマルサイクラーで次の反応ステップを行なう (Total 約 3 時間)。

98 $^{\circ}$ C	30 sec	25-35 cycles***
98 $^{\circ}$ C	15 sec	
62 $^{\circ}$ C*	5 min	
4 $^{\circ}$ C	Hold**	

\*NEB 社のオリジナルのプロトコルより 1 $^{\circ}$ C 低い設定となっている。この温度はサーマルサイクラーの個体差によって、至適温度の設定が若干異なる場合もある。N1/2, ARTIC V3 プライマーセットにおいては、至適温度よりも高くなると **64 番**のアンプリコンのカバレッジが低くなる傾向があることが分かっている。もし継続的に 64 番アンプリコンの低カバレッジが観察される場合、0.5-1 $^{\circ}$ C 温度を下げるような調整を行うと結果が向上する可能性がある。

\*\*1-2 日くらいは放置可

\*\*\* PCR の最適なサイクル数に関しては、検体の下記の表を参照すること。サイクル数が至適に近いほどより良い結果が出る。もし、その時に扱う検体の Ct 値が上から下まで幅広い範囲で分布する場合、Ct 値の低い検体について cDNA(あるいは RNA の時点で)ミリ Q 水で希釈し、他の検

体と足並みを調整する良い。

検体 Ct 値と至適 PCR サイクル数の目安

Ct 値	未調整	20 倍 希釈時	50 倍 希釈時
15 – 20	25 cycles	30 cycles	35 cycles
20 – 25	30 cycles	35 cycles	
25 – 30	35 cycles		

❗ 逆転写反応および multiplex PCR に関する注意点

- 鋳型 RNA、PCR 産物 DNA のコンタミネーションには十分注意すること。特に、Multiplex PCR 後のサンプルを処理する作業（3. プーリング・精製以降）とは場所、器具類等を共有しないようにすることが重要。

### 3. PCR 産物混合・精製及び定量

使用する試薬:

NEBNext Sample Purification Beads

80% エタノール

Qubit dsDNA HS Assay Kit

[ [動画](#)]

**3-1** 新しいプレート (or 8 連チューブ) を用意し、Pool 1 と Pool 2 の各 PCR 反応液からそれぞれ全量採取し混合する。

**3-2** NEBNext Sample Purification Beads 溶液をボルテックスでよく混ぜ、沈殿しているビーズを分散させる。NEBNext Sample Purification Beads 溶液を 20 µL を各サンプルに加え、よく混ぜる。5 分間静置する。

**3-3** ビーズの洗浄と DNA の溶出を行う。

1. プレートをマグネットスタンドに置き、磁気ビーズが磁石に集まり液が透明になるまで静置する。
2. 磁気ビーズ (DNA が吸着している) を吸わないように気を付けて、上清を除去する。
3. 150 µL の 80% エタノール (用事調製) を加える。
4. 30 秒間静置する。
5. 80%エタノールを除去する。
6. エタノール洗浄 (3~5) をもう一度繰り返す。
7. 残存したエタノールが揮発するまでマグネットスタンド上でそのまま静置する。1~2 分程度。完全に乾燥させる必要はない。
8. マグネットスタンドからプレートを取り出し、Milli-Q 水 50 µL を各サンプルに加え、磁気ビーズとよく混ぜる。
9. 1 分静置する。
10. マグネットスタンドで 2 分間静置する。
11. 上清を新しいプレートに移す。

**中断可能ポイント：-20℃で保存**

Oxford Nanopore Mk1c &  
NEB 社 ARTIC SARS-CoV-2 Companion Kit (ONT) 編 v.1.6

**3-4** Qubit dsDNA HS Assay Kit\* で DNA 濃度を測定する。

\*0.5 – 100 ng/μL の濃度範囲がある程度正確に測定できればその他の DNA 定量法でも可。  
NanoDrop (吸光度法) は低濃度域で精度が悪いので推奨しない。

## 4. End-prep & Barcode 結合

使用する試薬:

NEBNext Ultra II End Prep Reaction Buffer  
NEBNext Ultra II End Prep Enzyme Mix  
Native Barcodes  
Blunt/TA Ligase Master Mix  
NEBNext Sample Purification Beads  
Short Fragment Buffer (SFB)  
80% エタノール  
Qubit dsDNA HS Assay Kit

[  [動画](#) ]

**4-1** 新しいプレート (or 8 連チューブ) を用意し、各検体の精製した PCR 産物を DNA が総量 **50 ng/12.5  $\mu$ L** (すなわち 4 ng/ $\mu$ L)となるように Milli-Q 水で希釈する。

例 40 ng/ $\mu$ L DNA の希釈

精製 PCR 産物 (40 ng/ $\mu$ L)	1.25 $\mu$ L
Milli-Q 水	11.25 $\mu$ L
<hr/>	
Total 12.5 $\mu$ L	

### 少数サンプルにおける注意点

- サンプル数が少ない (4 検体以下) 場合、このプロトコルではプール後に十分な量のライブラリが得られない。その場合、でもシーケンシングを行うことができるがシーケンシング速度が通常よりも遅くなる (時間がかかる) ので予め注意すること。

[  [動画](#) ]

**4-2** 下記の End-prep 反応のマスターミックスをサンプル数分(+a)調製する。

End-prep Master Mix

試薬	容量
NEBNext Ultra II End Prep Reaction Buffer	1.75 $\mu$ L
NEBNext Ultra II End Prep Enzyme Mix	0.75 $\mu$ L
<hr/>	
Total	2.5 $\mu$ L

**4-3** 4-1 で希釈した 12.5  $\mu$ L DNA 溶液各ウェルに上記のマスターミックスを **2.5  $\mu$ L** ずつ加える。



4-4 プレート (or 8 連チューブ) に蓋をし、サーマルサイクラーにて下記の条件で反応させる。

20 °C	10 min
65 °C	10 min
4 °C	Hold

(Head-lid = 75 °C)

[  [動画](#) ]


4-5 新しいプレート (or 8 連チューブ) を用意し、4-4 の反応産物を含む以下の試薬類を混合する。

Barcode Ligation Reaction Mix	
試薬	容量
Milli-Q 水	6 µL
End-prepped DNA (4-4 の反応産物)	1.5 µL
Native Barcode (NBDxx)	2.5 µL
Blunt/TA Ligase Master Mix	10 µL
Total	20 µL

4-6 プレート (or 8 連チューブ) に蓋をし、弱めのボルテックス等で**良く混合 (粘性が高いのでしっかり混合)** しサーマルサイクラーにて下記の条件で反応させる。

20 °C	20 min
65 °C	10 min
4 °C	Hold

(Head-lid = 75 °C)

この間に、Mk1C で使用する予定の Flow cell の Flow cell check を行う (Mk1C 取り扱い説明書 1.1.3 参照)。 [  [動画](#) ]

[  [動画](#) ]

4-7 新しい 1.5 mL の低吸着チューブ (無ければ通常のエッペンチューブ) を **1 本** 用意し、4-6 の反応物全検体分をプールする。プール後、マイクロピペットのダイヤルを利用して、プールされた溶液の体積を正確でなくても良いので簡単に測定する(x µl)。

4-8 NEBNext Sample Purification Beads 溶液をボルテックスでよく混ぜ、沈殿しているビーズを分散させる。0.4 倍量の NEBNext Sample Purification Beads 溶液 (例えば x = 110 µL なら 44 µL) をプールされた 4-6 反応物に加え、よく混ぜる。5 分間静置する。

#### 4-9 ビーズの洗浄と DNA の溶出を行う。

1. チューブをマグネットスタンドに置き、磁気ビーズが磁石に集まり液が透明になるまで静置する。
2. 磁気ビーズ（DNA が吸着している）を吸わないように気を付けて、上清を除去する。
3. **250  $\mu\text{L}$**  の SFB を凝集したビーズをほぐすように加え、さらに蓋をしてボルテックスする。
4. 1 分間静置後、スピンドウンしチューブをマグネットスタンドに戻して再びビーズを集める。
5. 上清（SFB）を、ビーズを吸い込まないように注意しながら除去する。
6. SFB 洗浄（3~5）をもう一度繰り返す。
7. **200  $\mu\text{L}$**  の 80%エタノールをチューブをスタンドに設置したまま加える。30 秒そのまま静置。
8. 80%エタノールをビーズを吸い込まないように注意しながら除去する。
9. 残存したエタノールが揮発するまでマグネットスタンド上でそのまま静置する。1~2 分程度。完全に乾燥させる必要はない。
10. マグネットスタンドからプレートを取り出し、Milli-Q 水 **32  $\mu\text{L}$**  を加え、磁気ビーズとよく混ぜる。
11. 1 分静置する。
12. マグネットスタンドで 2 分間静置する。
13. 上清を新しい 1.5 mL の低吸着チューブ（無ければ通常のエッペンチューブ）に移す。

**中断可能ポイント：-20℃で保存**

#### 4-10 Qubit dsDNA HS Assay Kit\* で DNA 濃度を測定する。

\*0.5–100 ng/ $\mu\text{L}$  の濃度範囲がある程度正確に測定できればその他の DNA 定量法でも可。  
NanoDrop（吸光度法）は低濃度域で精度が悪いので推奨しない。

## 5. Adapter Ligation & 精製

使用する試薬:

- Adapter Mix II (AMII)
- NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer
- NEBNext Quick T4 Ligase
- NEBNext Sample Purification Beads
- Short Fragment Buffer (SFB)
- Elution Buffer (EB)

[  [動画](#) ]

**5-1** 新しい 1.5 mL 低吸着性チューブ(無ければ通常のエッペンチューブ)を一本用意し、精製したバーコード付き DNA 30 ng を 30  $\mu$ L (すなわち 1 ng/ $\mu$ L)となるように Milli-Q 水で希釈する。総量で 30 ng に満たなければ、そのまま希釈せず次に進む。もし総量で 10 ng に満たない場合、解析効率が著しく落ちるか、あるいは解析できないと考えられる。DNA が多すぎると、アダプターとインサートの比率が最適でなくなり、バーコードの振り分け効率が著しく低下するので 30 ng 以上入れないこと。

**5-2** 下記の反応液を調整する。

Adapter Ligation Reaction Mix	
試薬	容量
希釈後 barcoded DNA	30 $\mu$ L
Adapter Mix II (AMII)	5 $\mu$ L
NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer	10 $\mu$ L
NEBNext Quick T4 Ligase	5 $\mu$ L
Total	50 $\mu$ L

**5-3** 室温で 20 分反応させる。

**5-4** NEBNext Sample Purification Beads 溶液をボルテックスでよく混ぜ、沈殿しているビーズを分散させる。20  $\mu$ L (0.4 倍量)の NEBNext Sample Purification Beads 溶液を加え、よく混ぜる。5 分間静置する。

**5-5** ビーズの洗浄と DNA の溶出を行う。

80%エタノールは使わないので注意！誤って使ってしまった場合、アダプターに結合しているタンパクが変性するため解析は失敗する。5-2 あるいは 4-5 からやり直す。

1. チューブをマグネットスタンドに置き、磁気ビーズが磁石に集まり液が透明になるまで静置する。
2. 磁気ビーズ（DNA が吸着している）を吸わないように気を付けて、上清を除去する。
3. **250  $\mu$ L** の SFB を凝集したビーズをほぐすように加え、さらに蓋をしてボルテックスする。
4. 1 分間静置後、スピンドウンしチューブをマグネットスタンドに戻して再びビーズを集める。
5. 上清（SFB）を、ビーズを吸い込まないように注意しながら除去する。
6. SFB 洗浄（3~5）をもう一度繰り返す。
7. 残存した SFB を今一度注意深く除去する。
8. マグネットスタンドからプレートを取り出し、Elution Buffer (EB) **15  $\mu$ L** を加え、磁気ビーズとよく混ぜる。
9. 1 分静置する。
10. マグネットスタンドで 2 分間静置する。
11. 上清を新しい 1.5 mL の低吸着チューブ（無ければ通常のエッペンチューブ）に移す。

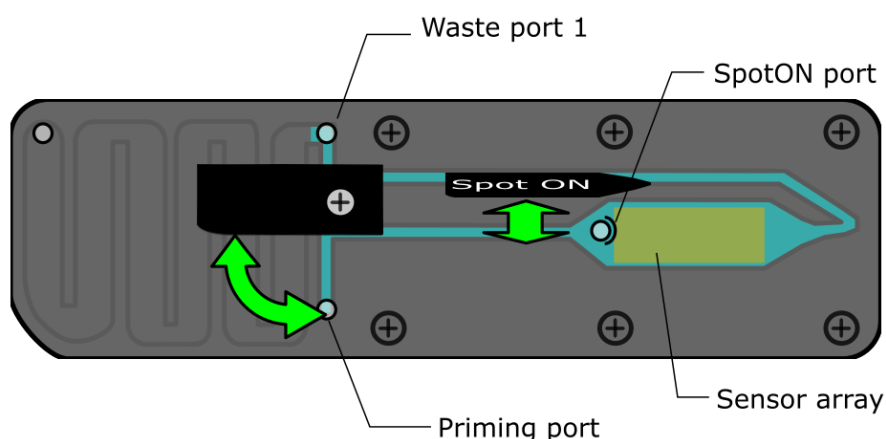
**中断可能ポイント：4°Cで数日保存可**

## 6. Priming と Loading

- Priming と loading の手順に関しては、ONT 社から下記のビデオ（日本語字幕あり）が提供されている。文章で伝えるよりもはるかに有用であるため事前に参照されることを推奨する。

[https://community.nanoporetech.com/nanopore\\_learning/lessons/priming-and-loading-your-flow-cell](https://community.nanoporetech.com/nanopore_learning/lessons/priming-and-loading-your-flow-cell)

<https://www.youtube.com/watch?v=Pt-iaemrM88>



使用する試薬:

- Flush Buffer (FB)
- Flash Tether (FLT)
- Sequencing Buffer (SQB)
- Loading Beads (LB)

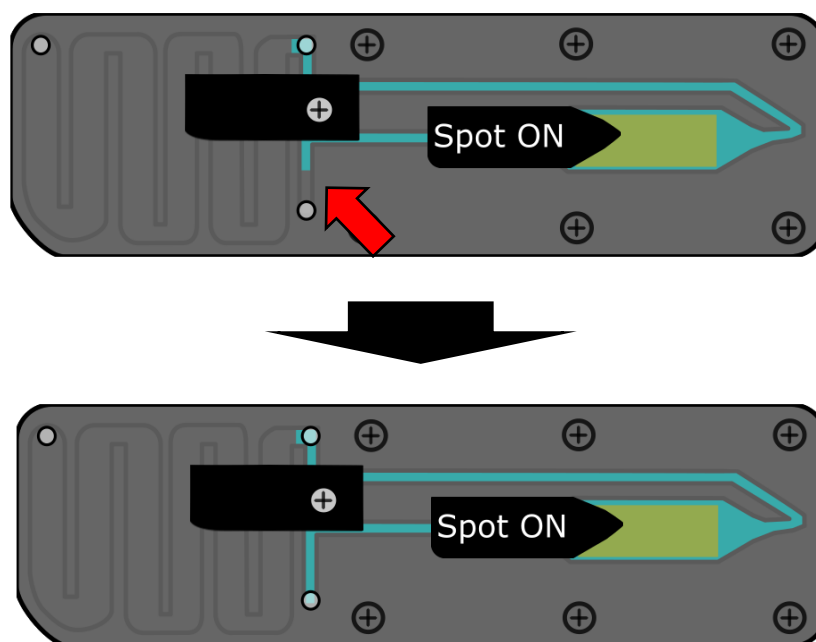
[ 動画 ]

**6-1** Flush Buffer (FB), Flash Tether (FLT), Sequencing Buffer (SQB), Loading Beads (LB)を冷凍庫から取り出し、融解する。融解後、氷上で保管。

**6-2** FB のチューブ一本に FLT を 30  $\mu$ L を直接加える。FB チューブは解析を一回するごとに一本使い切りである。

**6-3** Flow cell check を終えた flow cell について、Nanopore 社のマニュアルを基に priming を行う。ポアは空気に触れると失活するため、全ての操作において気泡等が Sensor array 内に入らないように注意する。最初に、Priming Port 入口付近から少しの間続く空気の部分（下図上部、赤矢印）が、気泡となり Sensor array 内に送り込まれないよう、Priming port から少量（ $\sim$ 10  $\mu$ L 程度）の吸引を行い Priming Port 入り口まで液が満たされている状態（下図下部）にする。その

後 800  $\mu\text{L}$  の priming 溶液を Priming Port からゆっくり加える。800  $\mu\text{L}$  全てを入れきる必要はなく、最終的にチップの先に少し液が残っているくらいが良い。これらの操作はピペットのプッシュボタンではなくダイヤルを回すことでより確実に行うことができる。**とにかく、Censor array に空気が入らないことが重要。**



[ 動画 ]

**6-4** 5 分間インキュベートする。この間、下記の試薬を新しい 1.5 mL 低吸着性チューブ (無ければ通常のエッペンチューブ) で混合する。

Sequencing Mix

試薬	容量	備考
Sequencing Buffer (SQB)	37.5 $\mu\text{L}$	スピンドウン程度で簡単にビーズ
Loading Beads (LB)	25.5 $\mu\text{L}$	が沈んでしまうので、直前にピペッティングで攪拌し直ぐに加える
アダプター結合済みライブラリ	12 $\mu\text{L}$	
Total	75 $\mu\text{L}$	

**6-5** Nanopore 社のマニュアルを基に 200  $\mu\text{L}$  の priming 溶液を Priming Port からゆっくりと加える。この時 SpotON sample port は開放した状態にしておく。滴下するたびに、SpotON sample port から中の液体が盛り上がってきて、また下がっていくのを確認する。気泡が入らないように

注意！

**6-6** 6-3 で調整した Sequencing Mix 再度ピペッティングで攪拌し、ビーズが懸濁した状態で全量を SpotON sample port に対して滴下しながらフローセル内に加える。この時、Priming port は開放した状態にしておく。

**6-7** SpotON sample port および Priming port を閉じる。

## 7. シーケンス RUN の開始

Mk1C の詳しい操作方法については ONT 社から提供されている操作マニュアル（日本語あり）を参照すること。ここではデフォルトから変更する必要があるパラメータ設定についてのみ記す。

- 1. Positions > Experiment Name:  
“nCoV”等任意の文字列。フォルダ名になる。個人や地域などが特定される情報を含む文字列は避ける。
- 1. Positions > Sample ID:  
任意の文字列。フォルダ名になる。省略可能。ライブラリを作った日付等にするとうい。個人や地域などが特定される情報を含む文字列は避ける。
- 2. Kit:  
SQK-LSK109
- 2. Kit>Barcode Expansion Pack:  
使用したバーコードのキットを選べばベースコールと同時に振り分けを行うが、感染研のサーバで自動的に振り分け処理から解析が始まるので不要。
- 3. Run Options > Run Length:  
一検体の解析に理想的なシーケンス量は、バーコードの振り分け効率（60—70%程度）も考慮して一検体 50Mb 程度である。したがって 12 検体の解析なら全体で少なくとも 600 Mb、24 検体なら 1.2 Gb をシーケンスすることが望ましい。一方で、R.9.4.1 フローセルのシーケンスの本プロトコルでのスピードは新品のフローセルを用いた場合平均で約 300 Mb/時間である。したがってこの場合、12 検体なら 3 時間（900 Mb）、24 検体であれば 6 時間（1.8 Gb）ほどシーケンスすれば十分なデータが得られることになる。しかし、シーケンスのスピードはフローセルのポア数に依存し、再生品でポア数が 500 程度しかない場合 2 倍以上の時間を要する。Mk1C を使い始めたばかりで、必要なラン時間の予想がつかなければ、あえて長い時間（24 時間）に設定しておいて、翌日朝シーケンス量が足りていればそこでデータ取得をストップすることもできる。逆にラン時間が短か過ぎてデータが足りていなければ、ランを再度設定し簡単に再開することもできる。
- 3. Run Options > Bias voltage:  
初回使用のフローセルならデフォルト値（-180 mV）のまま構わない。再使用のフローセルではそれまでの累積使用時間に応じて調整すると良い。



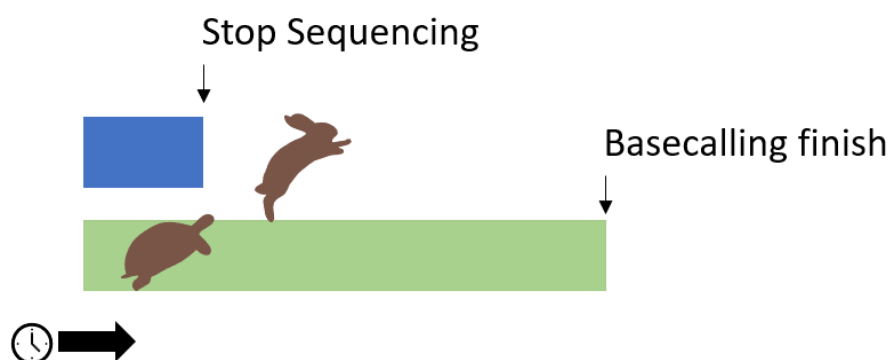
累積ラン時間	設定値
0 H (初回)	-180 mV
12 H	-190 mV
24 H	-210 mV
36 H	-230 mV

- 4. Basecalling>Basecalling:  
Hi-accuracy basecalling (HAC)
- 5. Output> FAST**5**> Compression:  
VBZ
- 5. Output> FAST**5**> Reads per file:  
20000
- 5. Output> FAST**Q**> Compression:  
Gzip
- 5. Output> FAST**Q**> Reads per file:  
20000

## 7. シーケンス RUN の (強制) 終了

Mk1C の詳しい操作方法については ONT 社から提供されている操作マニュアルを参照すること。

- Mk1C は設定時間経過後に自動的にシーケンシングを停止 (ベースコールの計算はその後も継続する) するため、停止するために特に操作はいらませんが、場合によっては強制的に終了したいこともある (既に十分なシグナルデータが得られている等)。その場合、Experiments メニューで実行中のランにチェックを入れ、[Stop]を選択することで停止できる。その際に、「Stop sequencing」か「Stop sequencing and basecalling」の選択を要求されるが、「Stop sequencing」を選択することで、ベースコールの計算はそのまま継続させることができる。
- ベースコール計算は Mk1C では 50 Mb/h 程度でしか進まないため、500 Mb のデータであれば合計約 10 時間を要する。
- フローセルの洗浄・取り外しはシーケンシングが終了していればベースコール中であっても行って構わない。



## 8. データのコピー・転送

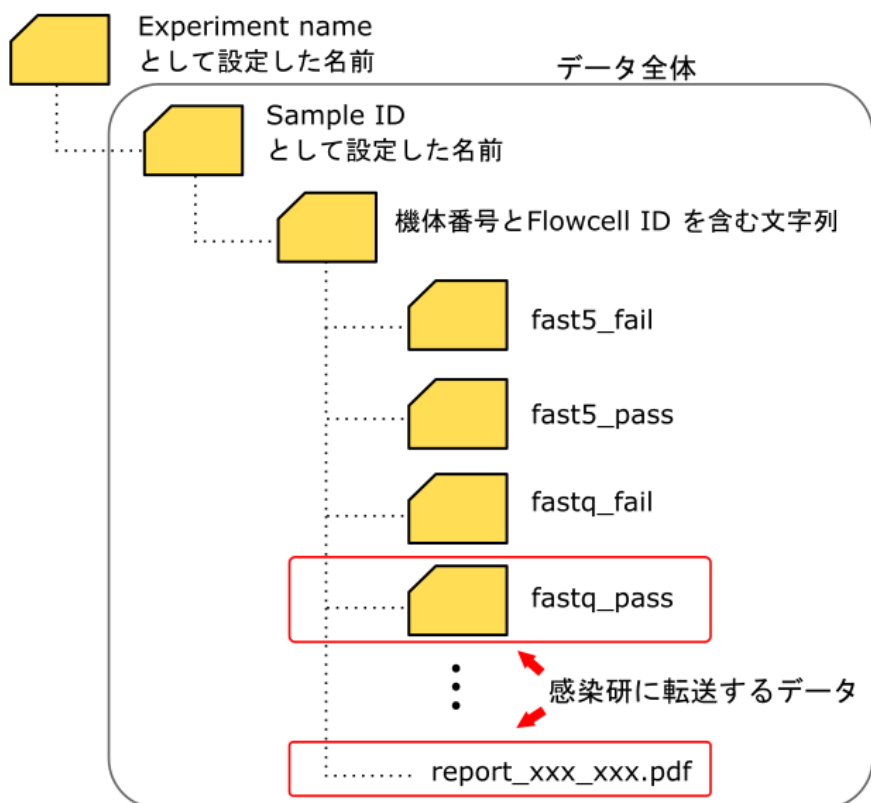
Mk1C の詳しい操作方法については ONT 社から提供されている操作マニュアルを参照すること。

ベースコールの完了を確認後、fastq\_pass フォルダおよび report xxx\_xxx.pdf ファイル（任意）を外付け HDD 等にコピーし、zip でまとめて感染研へ転送する。report\_xxx\_xxx.pdf は不具合があった際の参考にするためのデータであり、無くとも構わない。

その他のファイル（データ全体）に関しても、一定期間保存することが望ましい。Mk1C には一ランの解析で得られるデータの総量は 1 Gbase のシーケンス量に対して約 30 Gbyte になる。データの転送に関して、Mk1C は USB 経由での転送が非常に遅く、30 Gbyte のデータを外付けの HDD にコピーするために 2 時間以上要することを考慮されたい。LAN ケーブルを使用した PC へのファイル転送が早くて安定である（下記参照）。

### LAN ケーブル経由でのファイル転送

1. Mk1C と適当な windows PC を LAN ケーブルで直接接続する
2. Windows PC の IP アドレスを 192.168.0.2 に、サブネットマスクを 255.255.255.0 に設定
3. Mk1C の FileOption 画面で、“Shared as Samba user minit”ボタンをオンにする
4. Windows PC のファイルエクスプローラーから [¥¥192.168.0.1](http://192.168.0.1) を開くと、Mk1C の/data フォルダにアクセスできる。この時、ユーザー名・パスワードを聞かれるが、両方とも “minit”



Zip ファイルの名前に関しては、半角英数字 (ABCabc123) と半角ハイフン (-) のみ<sup>1</sup>が使える。また、**96 barcode (EXP-NBD196) kit を用いたデータについては、zip ファイル名の末尾を “-NBD196.zip” とする (2021 年 9 月時点での暫定処置)。** アップロードした機関等が分かるようなもので、過去に使用した名前と被らないように気を付ける (例 Example-pref-20210602.zip, Example-city-20210602.zip)

## 9. Flow cell 洗浄

- 使用したフローセルは Flow Cell Wash Kit (EXP-WSH004) を用いて内部の洗浄をすることで再生することができる。Flow Cell Wash Kit には DNase が含まれており、フローセル内の DNA を分解・除去する効果がある。このため、正しく洗浄操作が行われれば、前回のランでロードされたライブラリの残存 (carry-over) はほとんど無視できる程度 (<0.1%) に抑えることができる。しかし、始めの方は、carry-over の程度を確認する意味でも、同じフローセルで解析をする際には前回に使用したバーコードを避ける形で運用すると良い (例 一回目 NBD01~12, 二回目 NBD13~24)。
- R.9.4.1 フローセルは連続では 48 時間以上解析できるとされているが、ラン・洗浄を行うごとに有効なポア数は低下していく。感染研でこれまでに、本プロトコルによる SARS-CoV-2 のシーケンスを行った経験では、フローセルの利用回数は 3 回 (洗浄 2 回) が限度で、ゆとりをもって解析するためには 2 回程度 (洗浄一回) にした方が良さそう。フローセルチェックの際にポア数が 400 を下回るフローセルは使用を勧めない。

使用する試薬:

Wash Mix (WMX)

Wash Diluent (DIL)

Storage Buffer (S)

[  [動画](#) ]

9-1 下記の試薬類を混合する。

Flow Cell Wash Mix	
試薬	容量
Wash Mix (WMX)	2 $\mu$ L
Wash Diluent (DIL)	398 $\mu$ L
Total	400 $\mu$ L

9-2 Waste port 1 から Waste Channel 内にある液体を全て抜き取る。

9-3 Priming (6-3)と同じ要領で、priming port から空気を抜き、400  $\mu$ L の wash mix をゆっくりとロードする。Priming port の蓋を閉じる。

9-4 フローセルを一時間インキュベートする。この時、フローセルを Mk1C に設置した状態になると温度が上がるため洗浄効果が高い。

**9-5** Waste port 1 から Waste Channel 内にある液体を全て抜き取る。

**9-6** Priming port の蓋を開け、500  $\mu$ L の Storage Buffer (S) をゆっくりとロードする。Priming port の蓋を閉じる。

**9-7** Waste port 1 から Waste Channel 内にある液体を全て抜き取る。

**9-8** Flow Cell Check を行う。累積使用時間と残存している有効なポア数を記録する。

**9-9** 洗浄後のフローセルは 4  $^{\circ}$ C で保管する。

## FAQ

- report\_XXX\_XXX.pdf が作られていない

何らかの原因でベースコールが最後まで終わらずに途中で停止した可能性がある。既に十分なデータ量がベースコールされていれば、そのままベースコールされた分のデータをアップロードしてもよいが、もし、足りなさそうであれば下記に述べる再ベースコールを Mk1C で行う。

- 再ベースコールの実行方法

1. 左のメニューランから Start (再生マーク) を選ぶ。
2. 右上の Anaysis を選ぶ。
3. 一番左の Basecalling を選ぶ。
4. Input folder を選ぶところで、前回行ったランのフォルダを選ぶ。デフォルト設定では、選んだフォルダ以下にある生データを自動で探すので、どこか適当な階層のフォルダで構わない。
5. 出力先のフォルダを選ぶ。デフォルト設定では 4 で選ばれたフォルダに basecalling というフォルダが作られるので、それで構わなければ変更は不要。Outout.fast5.files は off にする。
6. Configuration で FLO-MIN106/\*\*\*\*\* DNA High-Accuracy を選ぶ。
7. 残りの項目は全て何も変更せず、最後に Start をクリックする。ベースコールの所要時間は約 50 Mb / h.
8. 4 で選んだフォルダに basecalling というフォルダができています。その中に “pass” あるいは “fastq\_pass” という名前のフォルダがあるので、そのフォルダごとコピーし、zip 化する。PDF は作られない。

- アップロードがうまくいかない

これまで、最も多いケースではファイル名に半角英数字 (ABCabc123) と半角ハイフン (-) 以外の文字が使われていたことである。その他では、ログイン後しばらく時間が経過していたため (1 時間程度)、自動的にログアウト状態になっていた等。

- Barcode unclassified の割合

概ね 15%以上、悪い時で 60%までである。これまでの知見から、barcode 結合 (>200 ng) , adapter 結合 (>30 ng) に過剰に DNA を持ち込むと barcode unclassified が多くなるようである。また、Ct 値に対して PCR のサイクル数が多すぎた場合も barcode unclassified が増えカバレッジの均一性も良くなる。

### 謝辞

本プロトコルの作成は、下記の支援を受け実施しました。

- 令和 3 年度 厚生労働科学研究費補助金・新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークを強化するための研究（19HA1001） 宮崎班」
- 令和 3 年度 日本医療研究開発機構 AMED 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業「病原体ゲノミクスを基盤とした病原体検索システムの利活用に係る研究 黒田班」